

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Erlangen
Direktor: Prof. Dr. N. Henning

**Untersuchungen über das Verhalten
der Brenztraubensäure, Ketoglutarensäure und
l-(+)-Milchsäure bei Lebererkrankungen**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Alexander-Universität
zu
Erlangen

Vorgelegt von
Friedrich Carl Sitzmann
aus Thurn

Dekan: Prof. Dr. F. Heim

Referent: Prof. Dr. N. Henning

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Juli 1959

Sonderdruck aus „Das Ärztliche Laboratorium“

Schriftleitung Dr. Dr. Ruppert, Würzburg

Laborarzt-Verlag, Würzburg, Katharinenstraße 3

6. Jahrgang

Dezember 1960

Heft 12

Seite 345-366

**Untersuchungen über das Verhalten der Brenztraubensäure,
Ketoglutarensäure und L-(+)-Milchsäure bei Lebererkrankungen**

Von F. C. Sitzmann und H. Schön

7542/
161



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Medizinischen Univ.-Klinik Erlangen
(Leiter: Prof. Dr. N. Henning)

Untersuchungen über das Verhalten der Brenztraubensäure, α -Ketoglutarsäure und 1-(+)-Milchsäure bei Leber- erkrankungen

von Friedrich Carl Sitzmann*) und Harald Schön, Erlangen

Die Bedeutung des Zitronensäurezyklus im Stoffwechselgeschehen wurde erst seit einigen Jahren voll erkannt und zwangsläufig damit erhob sich die Frage, wie man die Intermediärprodukte mit Hilfe einfacher Methoden exakt bestimmen kann.

Vor allem interessieren hier die Brenztraubensäure (BTS), die α -Ketoglutarsäure (α -KGS) und die 1-(+)-Milchsäure (MS) als wichtigste Metaboliten, da besonders diese Substanzen bei Stoffwechselstörungen in erhöhten Konzentrationen im Blute auftreten. So ist zum Beispiel ein erhöhter Brenztraubensäurespiegel bekannt bei Herzdekompensationen, Toxikosen, anoxämischen Zuständen und nach Operationen, bei Vitamin-B-Mangelzuständen, in der Schwangerschaft, bei spastischen Formen der multiplen Sklerose, nach Röntgenbestrahlung (55, 56), besonders bei hohen Graden der Leberparenchymschädigung, sowie im Diabetes mellitus und vor allem im diabetischen Koma.

Zur Beurteilung des gesamten Stoffwechselgeschehens ist die Bestimmung dieser Säuren im Blute klinisch von großer Bedeutung, aber auch praktisch im Bezug auf die Milchsäurebestimmung für die Arbeitsmedizin, Anaesthesie, bei Gas- und Stickstoffvergiftungen oder Kreislauf- bzw. Durchblutungsstörungen.

Die Methode zur Bestimmung von Brenztraubensäure, α -Ketoglutarsäure und Milchsäure zeigten in den bisherigen Arbeitsvorschriften nur eine geringe Reproduzierbarkeit und erschienen durch den großen Aufwand wenig lohnend.

Eine bekannte und lange Zeit hindurch ausgeführte BTS-Bestimmung im Blute war die nach Friedemann-Haugen (1).

Papierchromatographisch konnte das Hydrazon über eine Farbreaktion nachgewiesen und bestimmt werden. Zur Erhöhung der Spezifität benutzten Friedemann-Haugen Toluol als Extraktionsmittel. Der Toluolextrakt wurde mit Natriumkarbonat (Na_2CO_3) ausgeschüttelt; auch die Bestimmung der α -Ketoglutarsäure wurde auf diese Weise ausgeführt, wie Krebs (2) angibt. Im enteiweißten Blut können aber neben BTS noch eine Reihe anderer Metaboliten als hydrazonbildende Substanzen in Frage kommen und zwar alle Aldehyde, Ketone und Ketosäuren:

1. Azetessigsäure, die wie Markees (3, 5) berichtet, durch kurzes Kochen ausgeschaltet werden kann und außerdem durch vorherige Enteiweißung des Blutes mit Trichloressigsäure, wie Pletscher und Renschler (4) vorschlagen,
2. Ketoglutarsäure, die zwar durch die Wahl eines entsprechenden Extraktionsmittels semiquantitativ abgetrennt werden kann, aber nicht völlig auszuschalten ist,

3. Oxalessigsäure, die normalerweise nur in kleineren Konzentrationen vorliegt, kann allenfalls durch spontane Dekarboxylierung und
4. eine Reihe verschiedener Substanzen, wie Azetaldehyd, Methylglyoxal und freie Triosen zu einer geringen, scheinbaren Vermehrung der Brenztraubensäure führen.

Trotz dieser Fehlermöglichkeiten würde aber die Genauigkeit dieser kolorimetrischen Methode für die Routinediagnostik in Kliniken eventuell ausreichen.

Für wissenschaftliche Zwecke sollte man sich aber der enzymatischen Methoden bedienen; denn durch die Entwicklung dieser Testmethoden auf der Basis des optischen Tests nach Warburg und Christian (6) ist es möglich, nicht nur bestimmte Substrate des Zitronensäurezyklus im biologischen Material spezifisch quantitativ zu bestimmen, sondern auch die Aktivitäten der Fermente dieses Zyklus.

Sie haben gegenüber rein chemischen Bestimmungsmethoden den Vorteil, daß die Enzymproteine in Hinsicht auf ihre Spezifität bekanntlich die zuverlässigsten Reagentien darstellen, die man heute kennt.

Prinzip:

Grundlage aller enzymatischen optischen Tests ist die Änderung der Lichtabsorption eines an der Reaktion teilnehmenden Koenzyms oder Substrates.

Die Absorption des reduzierten Diphosphopyridinnukleotids (DPN-H) wird am häufigsten für solche Messungen herangezogen, so auch in den nachfolgenden Tests. DPN-H verliert als Reaktionsteilnehmer beim Übergang in die oxydierte Form (DPN) seine Absorptionsbande im Wellenbereich von 340 $m\mu$ -400 $m\mu$. Das Maximum der Absorption liegt für DPN-H bei 340 $m\mu$. Mißt man mit Photometern, deren Filter die Quecksilberlinie bei 366 $m\mu$ isolieren, so beträgt der Extinktionskoeffizient nur etwa die Hälfte!

Methodik:

Die in diesen Ausführungen folgenden Bestimmungen von Brenztraubensäure (BTS), α -Ketoglutar Säure (α KGS) und Milchsäure (MS) wurden im optischen Test mit dem Zeiss-Opton-Spektralphotometer ausgeführt.

Die Blutentnahme erfolgte derart, daß den Patienten früh nüchtern Blut aus der ungestauten Vene abgenommen wurde.

1. Bestimmung der Brenztraubensäurekonzentration in Serum:

In einem Zentrifugenglas wurden 2 ml Serum mit 2 ml 5%iger Perchlorsäure enteiweißt und nach gutem Durchmischen mit einem Glasstab 5-7 Min. bei 3000 U/Min. zentrifugiert. 2 ml des Überstandes wurden dann mit 0,7 ml einer 1m K_2HPO_4 -Lösung versetzt und 10 Min. im Eisbad stehen gelassen, damit sich der Perchloratniederschlag am Boden des Glases absetzte. Die Lösung war nun auf ein pH $\sim$ 6,5 gepuffert. Es wurden 2 ml zum Test eingesetzt.

Bestimmungsansatz:

In die 5 mm-Küvette wurden nacheinander pipettiert:

2,0 ml klarer (enteiweißt, perchloratfreier) auf pH $\sim$ 6,5 gepufferter Überstand
 0,05 ml DPN-H-Lösung (10 mg DPNH „Boehringer“ in 10 ml aq. bidest. gelöst;
 3×10^{-3} mDPNH).

Mit einem dünnen Glasstab wurde durchgemischt und die Extinktion (E_0) bei 366 $m\mu$ abgelesen. (Diese lag meist zwischen 0,5 und 0,6). Unmittelbar nach dieser Ablesung wurde mit einer Stangenpipette

0,01 ml MDH (Kristallsuspension 5 mg Protein/ml „Boehringer“) eingemischt und dann der Abfall in 1-Min.-abstand abgelesen und auf t_0 extrapoliert, um genauere Werte zu erhalten.

Berechnung:

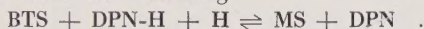
Die Reaktion verläuft unter den angegebenen Bedingungen stöchiometrisch. Eine Extinktionsdifferenz von 0,100 entspricht (gemäß dem Extinktionskoeffizienten für DPNH) für die Messung bei 366 m μ und 25° C einem Verbrauch von 0,029 μ Mol pro ml DPNH, damit auch ebensovielen μ Molen BTS/ml = 2,55 γ /ml oder 3,25 γ BTS/Küvette.

Um den BTS-gehalt im ml Serum des untersuchten Blutes zu erhalten, ist dieser Wert auf Grund der Verdünnungen bei der Enteiweißung (1+1) und der anschließenden Perchloratfällung (2+0,7), sowie des Einsatzes von 2 ml Probe mit 1,35 noch zu multiplizieren. Es gilt also für die Messung bei 366 m μ :

abgelesene Extinktionsdifferenz $\times$ 70,9 $\times$ F = γ BTS/ml Blutserum.

Bei dieser und den nachfolgenden Messungen im Photometer wurden Küvetten der halben vorgeschriebenen Schichtdicke verwendet (BTS und MS 0,5 cm statt 1,0 cm; KGS 1,0 cm statt 2,0 cm). In der Berechnung der Versuchsergebnisse ist das nach der angegebenen Formel errechnete Resultat daher mit 2 (= F) zu multiplizieren.

Die Reaktion verläuft nach der Gleichung:



Das Gleichgewicht liegt weit auf der Seite der MS und DPN. Die Reaktion verläuft unter erhöhter H⁺-Konzentration und DPNH im Überschuß schnell und führt BTS quantitativ in MS über. Das als H⁺-Donator fungierende DPNH wird in stöchiometrischem Verhältnis umgesetzt und dient als Meßgröße.

2. Bestimmung der α -Ketoglutarsäurekonzentration im Serum:

4 ml Serum wurden wie bei der BTS-bestimmung enteiweißt und mit 3 ml Triäthanolaminpuffer auf ein pH $\sim$ 7,6 gebracht und 10 Minuten ins Eisbad gestellt.

Bestimmungsansatz:

In die 10 mm-Küvette wurden nacheinander pipettiert:

4,0 ml klarer (auf pH $\sim$ 7,6 gepufferter) Überstand

0,05 ml DPNH-Lösung (wie oben angegeben)

Mit einem dünnen Glasstab wurde durchgemischt und die Extinktion bei 366 m μ und 25° C abgelesen (E_0). (Diese lag meist zwischen 0,3 und 0,4). Unmittelbar nach dieser Ablesung wurde mit einer Stangenpipette

0,01 ml GsDH (Kristallsuspension 5 mg Protein/ml in 2 m Ammonsulfat) eingemischt und dann der Abfall der Extinktion im 2-Min.-Abstand abgelesen und extrapoliert.

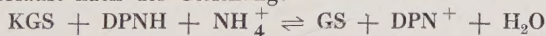
Berechnung:

Eine Extinktionsdifferenz von 0,100 entspricht bei 366 m μ einem Verbrauch von 0,029 μ Mol/ml DPNH, somit ebensovielen μ Mol KGS: im Küvetteninhalt von 4 ml also 8,607 γ KGS.

Unter Berücksichtigung der Verdünnungen (2 $\times$ 7/4 $\times$ 1/4) ist dieser Wert noch mit 0,87 zu multiplizieren, um den KGS-Gehalt im ml Serum zu erhalten. Es gilt also für die Messung bei 366 m μ :

abgelesene Extinktionsdifferenz $\times$ 74,33 $\times$ F = γ KGS/ml Blutserum

Die Reaktion verläuft nach der Gleichung:



Bei Überschuß an NH₄-Ionen und DPNH verlagert sich das Gleichgewicht dieser Reaktion völlig nach rechts und das α -Ketoglutarat wird in Gegenwart der GsDH (Strecker, 58) quantitativ in Glutamat überführt. Der Wasserstoffdonator DPNH wird in stöchiometrischem Verhältnis (1 Mol DPNH auf 1 Mol α KGS) umgesetzt und damit dient es als Meßgröße. Die Methode zeigt keine der bisher bekannten Substanzen im Blut oder Serum, außer α -Ketoglutarsäure, an.

Zusammensetzung des Triäthanolaminpuffers:

30 g Triäthanolamin p. a. (Riedel de Haen 31 148)

4,47 g KCl p. a. in 58 ml 2n HCl gelöst

auf 100 ml mit aqua bidest. auffüllen! Das im Triäthanolaminpuffer enthaltene K⁺(Cl)⁻ dient zur Perchloratfällung.

Diese Methode ist im Vergleich mit der von Seitz-Engelhardt-Goelkel angegebenen vereinfacht, da die Zugabe von Ammoniumacetat als Quelle für die bei der Reaktion erforderlichen NH_4 -Ionen wegfällt.

Zur Aufbewahrung der angesetzten DPNH-Lösung ist noch folgendes zu erwähnen: die DPNH-Lösung ist im gefrorenen Zustand (im Kühlfach des Kühlschranks!) länger haltbar. Es ist ratsam, sich eine Lösung von 10 mg DPNH in 10 ml aq. bidest. herzustellen und in 1 ml-Portionen aufzuheben. Das Pipettieren erfolgt am besten mit Stangenpipetten von 0,1 und 0,2 ml Fassungsvermögen, die 2 Eichmarken — je oben und unten — tragen.

3. Bestimmung der I (+)-Milchsäurekonzentration im Serum:

1 ml Serum wird wie in den vorherigen Bestimmungen mit Perchlorsäure enteiweißt, gut durchmischt und mit einer Semikarbazid-Glykokoll-Pufferlösung auf ein pH $\sim 10,5$ gebracht. Der Puffer enthält im einzelnen:

1,5 g Glykokoll nach Soerensen p. a. (Merck)
5,0 g Semikarbazidhydrochlorid p. a. (Merck)
32,0 ml 2nNaOH auf 100 ml aq. bidest. aufgefüllt.

Bestimmungsansatz:

In die 5 mm-Küvette wurden nacheinander pipettiert:

2,0 ml Pufferlösung (wie oben angegeben)
0,2 ml klarer Überstand nach Perchloratfällung, pH 10,5
0,2 ml DPN-reinst (100 mg DPN reinst „Boehringer“ ad 5 ml aq. bidest.)
0,03 ml MDH

Man schwenkt gut um und stellt die Testlösung samt Blindwert:

2,0 ml Pufferlösung (wie im Testansatz)
0,1 ml Perchlorsäure (wie zum Enteiweißen)
0,1 ml aq. bidest.
0,2 ml DPN-reinst (wie im Testansatz)
0,03 ml MDH

in ein Wasserbad von ca. 25°C für eine Stunde und liest dann gegen den Blindwert die Extinktion ab.

Berechnung:

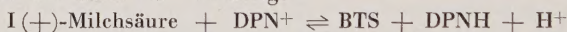
Eine Extinktionsdifferenz von 0,100 entspricht gemäß dem Extinktionskoeffizienten von DPNH für die Messung bei $366\text{ m}\mu$ $0,029\text{ }\mu\text{ Mol/ml DPNH}$, somit ebensoviele $\mu\text{ Molen/ml MS} = 6,280\text{ }\gamma\text{ MS/Küvette}$ (bei 25°C).

Unter Berücksichtigung der Verdünnungen ($2 \times 2 \times 1/0,2$) ist dieser Wert mit 20 zu multiplizieren, um den MS-Gehalt im ml Serum zu erhalten.

Es gilt also für die Messung bei $366\text{ m}\mu$:

abgelesene Extinktionsdifferenz $\times 1286 \times F = \gamma\text{ MS in der untersuchten Probe.}$

Die Reaktion verläuft nach der Gleichung:



Es liegt das Gleichgewicht weit auf der Seite der MS und DPN^+ . Durch das alkalische Milieu und den Überschuß an DPN und dadurch, daß die entstehende BTS durch das Semikarbazid abgefangen wird, kann es völlig auf die Seite von BTS-DPNH verschoben werden und MS wird quantitativ in BTS überführt. DPN^+ wird im stöchiometrischen Verhältnis reduziert.

Hohorst (7) stellt zu dieser Methode neuerdings fest, daß die entstehende DPNH bei der enzymatischen Milchsäurebestimmung in Gegenwart von Semikarbazid mit Luftsauerstoff zu einem gelben Derivat reagiert, welches im nahen UV-Licht geringere Extinktionen aufweist. Diese „Störreaktion“ soll durch eine Evakuierung des Versuchsröhrchens ausgeschaltet werden können. Sie vermindert sonst dauernd die durch Umsatz von MS entstehende DPNH-Extinktion. Könnte aber diese „Störreaktion“ nicht ausgeschaltet werden, dann wäre die Frage nach der Genauigkeit der Methode ein Problem der Konkurrenz zwischen enzymatischer und „Störreaktion“. Unter Verwendung hoher Enzymkonzentrationen ist die Reaktionszeit sehr kurz; außerdem stellt die Reaktion zwischen BTS und Semikarbazid eine nichtenzymatische dar, sodaß sie sehr rasch verläuft und die langsamere Störreaktion von DPNH und Luftsauerstoff in Anwesenheit von Semikarbazid hier nicht ins Gewicht fallen kann.

Alle angeführten Reaktionen verlaufen quantitativ infolge einer günstigen Gleichgewichtseinstellung. Die Ergebnisse werden auf stöchiometrischer Grundlage berechnet.

Die Messungen im Photometer erfolgten bei BTS und α -KGS gegen Wasser, bei der Milchsäurebestimmung gegen einen Reagentienblindwert bei 366 m μ .

Störungen:

Perchlorationen oder Trichloressigsäure stören auch in den größten Verdünnungen die Reaktion. Die sorgfältige Ausfällung des Perchlorates bzw. Neutralisation der Trichloressigsäure mit geeigneten Reagentien ist daher unbedingt notwendig. K-, Na- und Cl-Ionen haben innerhalb der im menschlichen Serum, auch unter pathologischen Umständen, vorhandenen Konzentrationen, keinen Einfluß auf den Ablauf der Reaktion.

Das menschliche Serum enthält auch gewisse Substrate anderer DPN-H-abhängiger Dehydrogenasen (Hess und Gehm, 8), wie Dioxiazetonphosphat, Oxalessigsäure u. s. f. Es entfällt aber eine Störung durch diese Stoffe, da ihr enzymatisches Nachweis nur verschwindend geringe Konzentrationen ergab, sodaß der Verbrauch an DPNH durch andere Wasserstoffakzeptoren bei der Bestimmung der Fermentkinetik kaum ins Gewicht fällt.

Sollten in stark pathologischen Fällen dennoch derartige Substrate auftreten, so können Nebenreaktionen durch Zusatz von kristalliner Milchsäuredehydrogenase (MDH) im Überschuß vermieden werden. Es kann dadurch die Reaktionsgeschwindigkeit auf wenige Sekunden herabgesetzt werden. (Darstellung der MDH: siehe Pfeleiderer, Beisenherz, Bücher, Czok, Garbade, Meyer-Arendt, [9] Dixon, Zerfas [59] und Straub [60]).

Außerdem empfiehlt es sich, nur vollkommen hämolysefreies Serum zu verwenden, denn Hämolyse stört die Bestimmungsmethoden. Durch Austritt des Blutfarbstoffes aus den Erythrozyten wird die Extinktion stark erhöht.

Die Freisetzung der MDH aus den roten Blutkörperchen beeinflusst die Reaktionsabläufe nicht, da die bluteigene MDH durch die Enteiweißung zerstört wird. Bock, Löhr und Waller (10) konnten bei Leberparenchymschäden nachweisen, daß der Enzymaktivität der Erythrozyten ohne Konzentrationszunahme erhöht ist, besonders im Koma.

Bei diesen hier angegebenen Methoden (siehe auch Horn und Bruns (11) und Wallenfells (12)) treten keine der bisher bekannten im Blute oder Serum vorkommenden Substanzen störend auf.

Es war das Ziel dieser Untersuchungen, festzustellen, ob man aus dem Verhalten von BTS, α -KGS und MS die Diagnose eines bestimmten Leberparenchymschadens stellen kann und daraus eine Aussage über die Prognose solcher Krankheiten machen darf oder ob man einen Hinweis für die heute noch so unterschiedliche Therapie erhalten kann.

Krankengut:

Die Untersuchungen der drei intermediären Stoffwechselprodukte wurden in erster Linie bei Patienten mit Lebererkrankungen (Hepatitis, Zirrhose, mechanischer Ikterus) ausgeführt und wo es möglich war, im Verlauf der stationären Behandlung die genannten Metaboliten des öfteren bestimmt. Es wurden außerdem BTS-, α -KGS- und MS-Bestimmungen bei Patienten mit Leberschäden verschiedener Genese (Cholecystitis, Cholangitis, Metastasenleber, Morbus Hodgkin u. s. w. angestellt und verschiedene spezielle Kontrollen und Enzymaktivitätsbestimmungen im menschlichen Serum (und im Rattenserum) angeschlossen.

Im einzelnen wurden untersucht:

Fälle von Hepatitis	: 42 mit 79 Einzeluntersuchungen
Fälle von Koma hepaticum	: 5 mit 5 Einzeluntersuchungen
Fälle von mech. Ikterus	: 27 mit 36 Einzeluntersuchungen
Fälle von Leberzirrhose	: 31 mit 46 Einzeluntersuchungen
Leberschäden anderer	
Genese	: 24 mit 37 Einzeluntersuchungen

Angeregt durch die Aussagen von Redetzki, Bloedorn und Bansi (Klin. Wschr. 34, 1956: 845) wurden vergleichende Untersuchungen von BTS, KGS und MS mit Vollblut und Serum (beim gleichen Patienten) ausgeführt. Das Vollblut wurde dabei sofort am Krankenbett mit 5%iger Perchlorsäure im Verhältnis 1:1 unter starkem Umrühren enteiweißt, abzentrifugiert und weiterbehandelt wie oben angegeben.

Außerdem wurden noch zusätzlich die BTS-, KGS- und MS-Werte von „Herz- und Leberblut“ (Pfortaderblut), gewonnen bei Herz-Katheterisierungen, im Serum zum Vergleich gestellt.

Zur Beurteilung der Ergebnisse wurden gleichartige Untersuchungen der drei Substanzen an einer Gruppe (19 Personen) stoffwechselgesunder Individuen, ohne Leberschaden ausgeführt.

Ergebnisse:

1. Normalwerte von BTS, α -KGS und MS im Serum (19 Personen)

Tabelle 1

Fall Nr.:	Datum	BTS: γ %	α KGS: γ %	MS: mg %	Bemerkung:
1	15. 12. 56	314,87	173,01	14,364	nicht nüchtern
2	15. 12. 56	188,32	103,80	7,686	nüchtern
3	17. 12. 56	146,78	177,68	15,326	nüchtern
4	16. 1. 57	127,62	178,75	16,632	nüchtern
5	16. 4. 57	293,60	207,60	25,446	nicht nüchtern
6	15. 1. 57	131,44	164,90	6,426	nüchtern
7	17. 1. 57	215,54	169,11	8,846	nüchtern
	18. 1. 57	298,52	177,60	10,608	nüchtern
8	31. 1. 57	283,60	167,84	5,431	nüchtern
	15. 4. 57	184,34	164,00	6,983	nüchtern
	15. 5. 57	184,34	155,79	10,206	nüchtern
9	31. 1. 57	326,14	200,90	13,602	nicht nüchtern
10	1. 2. 57	269,42	164,90	10,240	nüchtern
11	1. 2. 57	300,50	171,01	6,331	nüchtern
12	1. 2. 57	289,23	166,78	8,846	nüchtern
13	1. 2. 57	311,29	174,39	9,576	nüchtern
14	11. 4. 57	319,05	177,00	13,602	nüchtern
15	15. 4. 57	215,61	166,52	7,503	nüchtern
	24. 4. 57	340,32	189,43	14,364	nicht nüchtern
16	24. 5. 57	175,38	177,00	5,298	nüchtern
17	22. 5. 57	311,96	143,77	9,675	nüchtern
18	22. 5. 57	300,14	180,00	7,503	nüchtern
19	31. 5. 57	285,23	177,20	4,230	nüchtern

Der Durchschnittswert bei Nüchternen beträgt:

Für BTS = 290,43 γ %
Für KGS = 165,68 γ %
Für MS = 12,54mg %

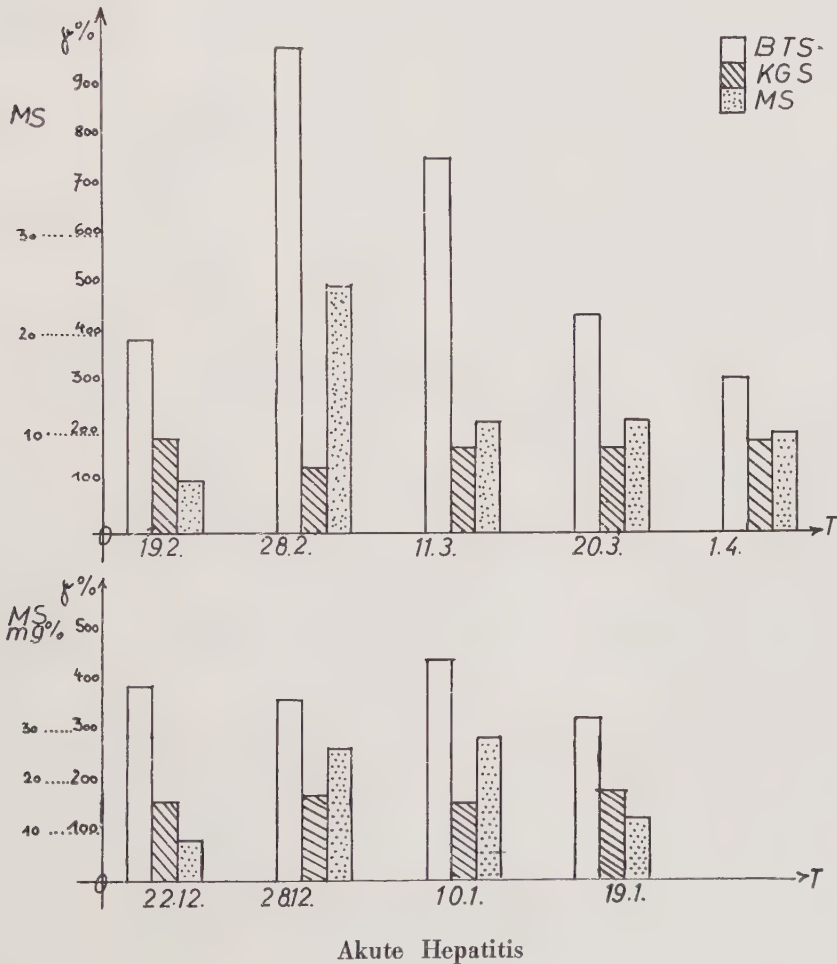
Der Durchschnittswert bei nicht Nüchternen beträgt:

Für BTS = 320,00 γ %
Für KGS = 199,30 γ %
Für MS = 17,80mg %

2. Akute Hepatitis (10 Personen):

Bei Patienten mit akut beginnender Hepatitis fand man nur eine geringe Erhöhung der Brenztraubensäurekonzentration, die im Verlauf der Erkrankung langsam anstieg und schließlich zum Normalwert wieder zurückkehrte. (Siehe Abb. 1 und 2).

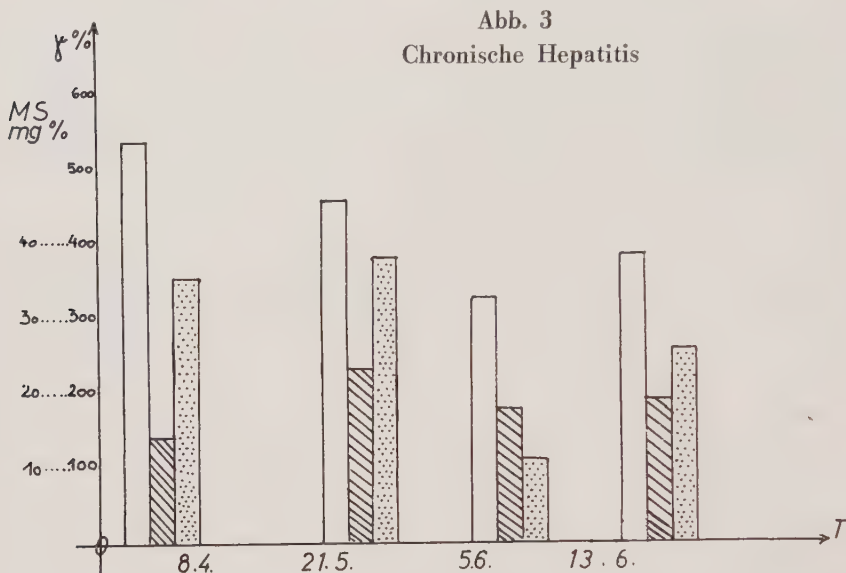
Abb. 1/2



3. Chronische Hepatitis (32 Personen):

Bei chronischen Hepatitisfällen war zu Beginn der Untersuchungen die BTS mehr oder weniger stark erhöht im Vergleich zu den akuten, sie nahm im Laufe der Krankheit trotz eingeleiteter Therapie zu und sank dann wieder ab. (Siehe Abb. 3).

Die MS stieg in allen Fällen parallel der BTS an und zeigte das gleiche Verhalten fast bei allen Hepatitiden wie die BTS.



Der Serumspiegel der α -Ketoglutar Säure lag in den meisten Fällen bei Beginn der akuten und chronischen Hepatitis unter dem Normalwert von ca. 170,00 γ %.

Bei akuten und z. T. auch bei den chronischen Hepatitiden konnte man im Verlaufe des Leberparenchymschadens mit einem Ansteigen der BTS einen Abfall der α KGS beobachten und umgekehrt, bis am Ende der Krankheit beide Säuren ihren Normalserumwert erreicht hatten, während in 2 Fällen mit dem BTS-Anstieg auch ein α KGS-Anstieg verzeichnet werden konnte. In diesen beiden Fällen handelt es sich um chron. Hepatitiden und die erhobenen Befunde hier gleichen denen bei der Lebercirrhose, wie später gezeigt wird.

4. Hepatisches Koma:

Im Koma hepaticum sind Brenztraubensäure, α -Ketoglutar Säure und Milchsäure immer erhöht. Verschiedene Reihenuntersuchungen während eines Komats zeigten einen sehr hohen Anstieg der Brenztraubensäure und falls die Patienten nicht ad exitum kamen, einen anschließenden Abfall.

5. Mechanischer Ikterus:

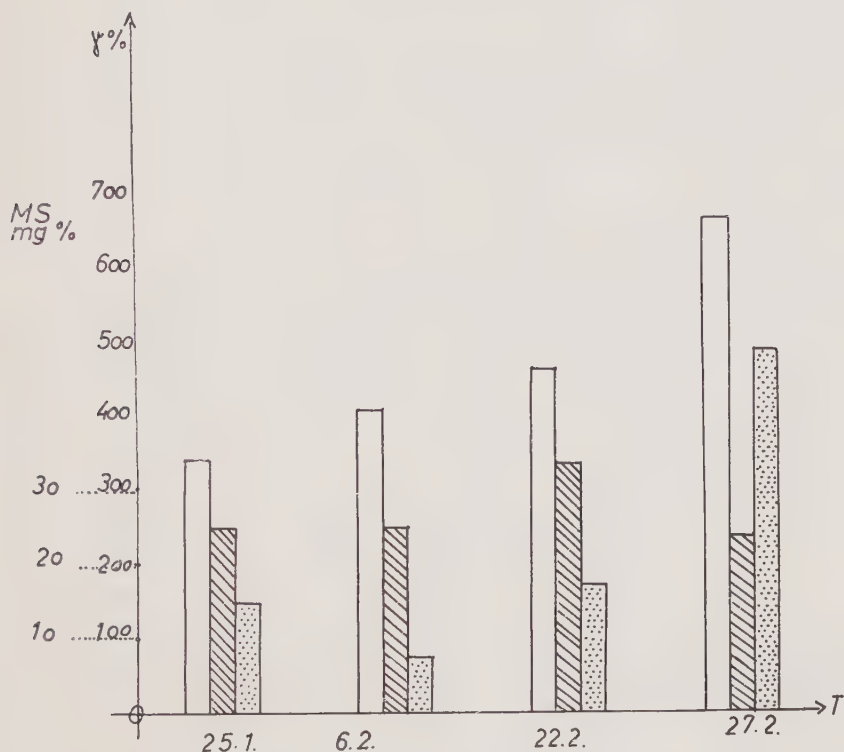
Beim mechanischen Ikterus, ganz gleich welcher Ätiologie, waren die Blutserumspiegel aller drei Metaboliten, vor allem der Anstieg der α -Keto-

glutarsäure z. T. recht beträchtlich. Mit Abnahme der BTS im Serum und der MS, konnte auch ein Rückgang der α -Ketoglutarsäure beobachtet werden (s. Abb. 4).

6. Lebereirrhose:

Schwierig ist es, eine bestimmte Aussage über das Verhalten von Brenztraubensäure, α -Ketoglutarsäure und Milchsäure bei Leberzirrhosen zu machen.

Abb.
Mechanischer Ikterus



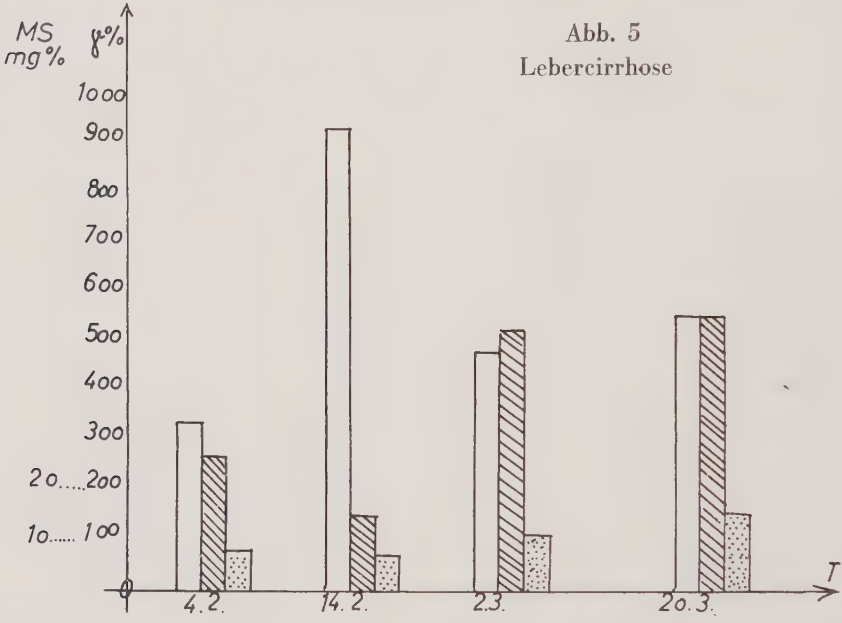
In den meisten Fällen konnte eine mehr oder weniger stark erhöhte BTS-Konzentration festgestellt werden und auch entsprechendes bei der MS und bei der α -KGS. Die Werte schwankten aber erheblich innerhalb einer großen Breite. In 2 Fällen lagen die BTS-Werte anfangs über dem Normalwert, in der 2. Untersuchung weit unter dem Normalwert und stiegen dann im Laufe der Zeit wieder ganz erheblich an, während die MS-Werte in diesen beiden Fällen abnahmen und die α -KGS ein uncharakteristisches Verhalten zeigte.

Aus dem Verhalten der Untersuchungsergebnisse bei Lebereirrhosen im Verlaufe der stationären Behandlung in der hiesigen Klinik kann keine bestimmte Schlußfolgerung oder Gesetzmäßigkeit abgelesen werden. In 3 Fällen lag bei einer einmaligen Bestimmung der BTS-Spiegel weit unter dem Normalwert, α -KGS war auffallend hoch (nur in 2 Fällen), während die MS-Werte im Bereich der Norm gelegen waren (s. Abb. 5).

7. Leberschäden verschiedener Genese:

In Fällen von Lebermetastasen und Leberschäden allgemeiner Art wurden meist hohe Brenztraubensäurewerte gefunden.

Die KGS war großen Schwankungen unterworfen, in einem Fall war sie extrem niedrig (Fall eines „Cancer en cuirasse“ bei Mamma-Ca), bei Cholecystitis lagen die Werte (außer 1 Fall) im Normalbereich. BTS, KGS und MS wurden noch bestimmt in 2 Fällen von Morbus Hodgkin, Cholangitis,



Hämochromatose und in 2 Fällen von Anämien. Aus den Ergebnissen kann aber nichts Endgültiges abgelesen werden; es sind hierfür Reihenuntersuchungen notwendig.

8. Vergleichende Untersuchungen mit Nativblut und Serum:

Die Bestimmungen wurden für BTS, KGS und MS im Vollblut und im Serum der gleichen stoffwechselgesunden Person ausgeführt. Die Ergebnisse zeigen, daß die Serumwerte für BTS und KGS wesentlich niedriger liegen als im Nativblut, während bei der Milchsäure die Serumwerte höher zu sein scheinen.

Tabelle 2
(Vergleichswerte zwischen Nativblut und Serum)

Vers. Nr.	BTS: γ%		α KGS: γ%		MS: mg%	
	Serum:	Nativbl.	Serum:	Nativbl.	Serum:	Nativbl.
1	184,34	303,53	155,70	209,50	10,206	14,364
2	311,96	500,34	258,00	281,20	32,760	21,042
3	483,51	539,55	144,80	257,60	16,900	9,675
4	334,33	407,21	197,30	216,70	11,592	5,166

9. Vergleichende Bestimmungen mit „Herz- und Leberblut“:

Tabelle 3

Vers. Nr.:	BTS:		α KGS:		MS:	
	Leber- blut	Herz- blut	Leber- blut	Herz- blut	Leber- blut	Herz- blut
1	482,12	397,00	224,90	218,9	22,68	20,268
2	296,90	237,4	328,79	300,4	48,52	41,942
3	326,14	303,6	326,00	255,0	22,84	22,432
4	850,21	411,5	259,5	200,4	15,24	13,648
5	297,70	209,7	205,6	155,7	13,60	10,080

Es zeigen sich geringe Unterschiede in den Konzentrationen und zwar sind die BTS-, α -KGS- und MS-Werte im Leberblut (Pfortaderblut) höher als im „Herzblut“. Es wurden aber nur 5 Vergleichsbestimmungen ausgeführt, sodaß sich daraus kein Schluß ziehen läßt.

10. Ergebnisse nach Gabe von Diphenylaethylenessigsäure und Phenylaethyl-essigsäure:

Nachdem die Normalwerte von BTS, α -KGS und MS bei diesen Patienten (sie litten alle an Fettsucht) vor Beginn dieser Behandlung festgestellt worden waren, wurden nach 8 Tagen die Bestimmungen wiederholt. Nach dieser Zeit waren die intermediären Stoffwechselprodukte angestiegen und nahmen im Laufe der Zeit bei weiterer Gabe von Diphenylaethyl-essigsäure und Phenylaethyl-essigsäure (in Tablettenform 4 Tabl./Tag) noch mehr zu. Im Fall 6 jedoch fällt auf, daß die α -KGS stark abgesunken ist, während man bei der MS einen sehr hohen Konzentrationswert im Serum feststellen konnte.

Tabelle 4

Fall Nr.	Datum	BTS: $\gamma^0/0$	α KGS: $\gamma^0/0$	MS: mg $^0/0$	Leberlabil. TakThy	pr. Chol. ZnSO ₄	BKS:
1	10. 1. 57	226,8	370,3	10,20	14	19	
	23. 1. 57	396,8	200,4	20,33			
2	12. 3. 57	321,2	156,63	19,53	10	8	
	26. 3. 57	496,3	138,4	43,20			
	2. 4. 57	709,0	183,4	51,14			
3	26. 3. 57	411,22	190,3	25,55	6	6	14/23
4	10. 5. 57	300,37	185,77	9,45			165,3
	18. 5. 57	326,14	177,42	14,87	80	14 14	179 25/51
5	1. 8. 57	248,15	177,00	23,58			
	2. 8. 57	219,79	164,35	18,96	90	11 10	231 23/43
	9. 8. 57	503,39	190,30	25,76			
	24. 8. 57	432,49	224,49	26,10	80	15 11	235 12/30
6	2. 8. 57	389,95	224,90	23,121	4	5 211	9/18
	4. 8. 57	411,22	242,24	23,436			
	14. 8. 57	457,31	138,40	54,199			
	19. 8. 57	524,76	146,35	65,199			

Diskussion:

Es muß zunächst festgehalten werden, daß die mittels des optischen Enzymtestes gefundenen Werte der Brenztraubensäure, der α -Ketoglutar- säure

und der Milchsäure um 30-40% niedriger liegen, als die mit der 2,4-Dinitrophenylhydrazinmethode nach Friedemann-Haugen (1) gefundenen (und auch mit anderen Testen). Auch Bauer (20) hat dieses in seinen Versuchen über die Brenztraubensäurekonzentration im Blute (bei multipler Sklerose) feststellen können und folgende Vergleichswerte geliefert:

BTS (mg%) im Serum bestimmt mit:

optischem Enzymtest:	Methode nach Friedemann:
0,69	1,09
0,63	0,89
0,99	1,48
0,53	2,08
0,67	1,09

Die bisherigen Normalserumkonzentrationen waren je nach der Methode großen Schwankungen unterworfen. So wurden diese von Kleeberg (19) mit 0,5-1,1 mg% angegeben, bei starker Hepatitis, Zirrhose und akuten Gallenkoliken mit 1,2-2,0 mg% und im Koma hepaticum mit 5,6 mg% für die Brenztraubensäure. Amatuzio (21) gibt für BTS einen Wert von 1,03 mg% an, bestimmt mit der Methode nach Friedemann-Haugen (1), in einer anderen Arbeit (17) Werte von 1,02 mg% (auch im Liquor cerebrospinalis), ebenso Kipping (22) und Seligson, Smith und Ettinger (23).

Aber auch mit den enzymatischen Testmethoden wurden anfangs sehr unterschiedliche Normalwerte gefunden. Bing (24) findet für BTS 0,5 mg% und für MS 16,46 mg%, fast die gleichen Angaben findet man bei Pfeiffer, Schoeffekin und Steigerwald (25) und in den Ausführungen von Pfeiffer (26), der aber seine Werte mit heparinisiertem Vollblut bestimmte. (Es muß aber von einem Heparinzusatz zu Vollblut gewarnt werden, da stets höhere Konzentrationen der fraglichen Säuren bei enzymatischen Analysen in heparinisiertem Blut gefunden werden, als im Nativblut).

Hess (27) findet mit seiner eingangs besprochenen Methode (Benutzung der bluteigenen MDH) eine normale BTS-Konzentration von 0,4 mg% bei Nüchternen und stoffwechselgesunden Personen.

Der Blutspiegel der α -Ketoglutarensäure liegt äußerst niedrig, es wurden bisher Werte zwischen 0,13-0,24 mg%, ein allgemeiner Zwischenwert von 0,184 mg%, angegeben; bei der enzymatischen Methode 0,17 mg%, was den mit der hier beschriebenen Methode gefundenen Werte entsprechen würde. Mit heparinisiertem Vollblut liegt dieser Wert bei 0,23 mg%. Gey (28) berichtet von Konzentrationen der α -KGS zwischen 0,09-0,18 mg% bei heparinisiertem Vollblut mit der papierchromatographischen Methode nach Friedemann-Haugen.

Für die Milchsäure werden Normalwerte bis 15 mg% (Pfleiderer) angegeben, teilweise sogar bis zu 30 mg% nach Schoeffekin-Pfleiderer (25), was aber bei weitem zu hoch sein dürfte.

Nach der oben beschriebenen Methode wurden die in den einzelnen Tabellen aufgeführten Konzentrationen für BTS, α -KGS und MS im Serum festgestellt, die mit denen von Bauer (20) gefundenen fast übereinstimmen.

Amatuzio (18) berichtete vor einigen Jahren noch in einer seiner Arbeiten, daß in den Gruppen der Hepatitisfälle kein Anstieg der BTS sicher festzustellen wäre, was aber inzwischen durch mehrere Untersuchungen entkräftigt wurde. Während Altschule und Holiday (29) bei beginnender Hepatitis einen BTS-Anstieg im Serum bis zu 0,55 mg% feststellten, sah Hess (30) sogar eine Verdoppelung der BTS-Werte in diesen Fällen. Die bei der Hepatitis gefundenen Ketoglutar Säurewerte stimmen mit den Befunden von Gey (28) überein, der ebenfalls Werte unter 0,18 mg% bei Hepatitiden findet, während Strohmayr (31), Martini und Klingmüller eine starke Erhöhung der Ketoglutar Säure und der

Milchsäure und BTS, als auch der DPN fanden. Die Erhöhung der BTS, α -Ketoglutar säure und MS im hepatischen Koma geht gleichzeitig einher mit einem Mangel dieser Säuren jenseits der Blutliquorschanke im Gehirn, wie Martini (32) nachweisen konnte. Durch die Herausnahme der α -KGS aus dem Zitronensäurezyklus des Gehirns durch den erhöhten Ammoniakgehalt soll die Bildung von energiereichem Phosphat gestört sein, wie Bessmann (33, 34) berichtet. Damit wird der Zitronensäurezyklus unterbrochen und die oxydative Phosphorylierung wird reduziert.

In der Tat ist der Sauerstoffverbrauch des Gehirns im Leberkoma vermindert, was diese Annahme stützt. Auch Amatuzio (18) stellte die höchsten BTS-Werte während des hepatischen Komats fest. Dieser Höchstwert wird in einem steilen Anstieg erreicht und fällt dann wieder langsam ab, falls die Patienten nicht ad exitum kamen.

Beim mechanischen Ikterus wurden Serumwerte von BTS, α -KGS und MS gefunden, die in einer Arbeit bei Lodigiani (35) über das Verhalten der BTS bei Lebererkrankungen bestätigt werden (bis zu 1,82 mg%).

Auch Horn und Amelung (36) berichten bei malignen Verschlüssen (Papillen-, Choledochus-, Gallenblasenverschluß, Metastasen) von stark erhöhten Werten, ebenso bei Steinverschlüssen und halten die Bestimmung dieser Säuren, vor allem der BTS, besonders bei Lebererkrankungen für eine wichtige Ergänzung der diagnostischen Methoden und eine wertvolle Hilfe bei differential-diagnostischen Fragestellungen.

Über das Verhalten der Stoffwechselprodukte Brenztraubensäure, α -Ketoglutar säure und Milchsäure bei Leberzirrhosen können auch andere Autoren, wie Amatuzio und Gey (28), Gastaldi und Maggi (37) keine einheitlichen Aussagen machen. Meist werden erhöhte BTS-Werte, aber ganz verschiedene für die α -KGS angegeben, die teils stark angestiegen, zum Teil sehr niedrig liegen oder im Bereich der Normalwerte schwanken. Auch Dawson, Groote, Rosenthal und Scherlock (61) können keine konstante Änderung der α -KGS feststellen.

Lasch (38) berichtet in einer größeren Arbeit über die BTS bei Leberkrankheiten, wobei die Bestimmung der BTS im Blute bei dieser Krankheitsgruppe als Zeichen einer Störung des BTS-Stoffwechsels durch die Leberzellschädigung bei allen untersuchten Patienten mit Hepatitis, homologer Serumhepatitis oder Zirrhose eine mehr oder weniger starke Erhöhung der BTS über 1 mg% ergeben hat (Methode nach Friedemann-Haugen), wobei die schwersten Fälle, vor allem dekompensierte Zirrhosen oder praekomatoese Hepatitisfälle Werte bis zu 4,50 mg% aufwiesen, während Patienten mit einem Verschlußikterus ohne Schädigung des Leberparenchyms Normalwerte unter 1 mg% zeigten, im Gegensatz zu den hier angeführten Befunden. Beim Koma und Praekoma konnte Lasch gleichzeitig mit Verringerung der BTS, was im Widerspruch zu unseren Ergebnissen steht, auch eine solche der Alkalireserve nachweisen (Azidose!).

Anhand der Darlegungen ist ersichtlich, wie unterschiedlich die Ergebnisse auf diesem Gebiet sind.

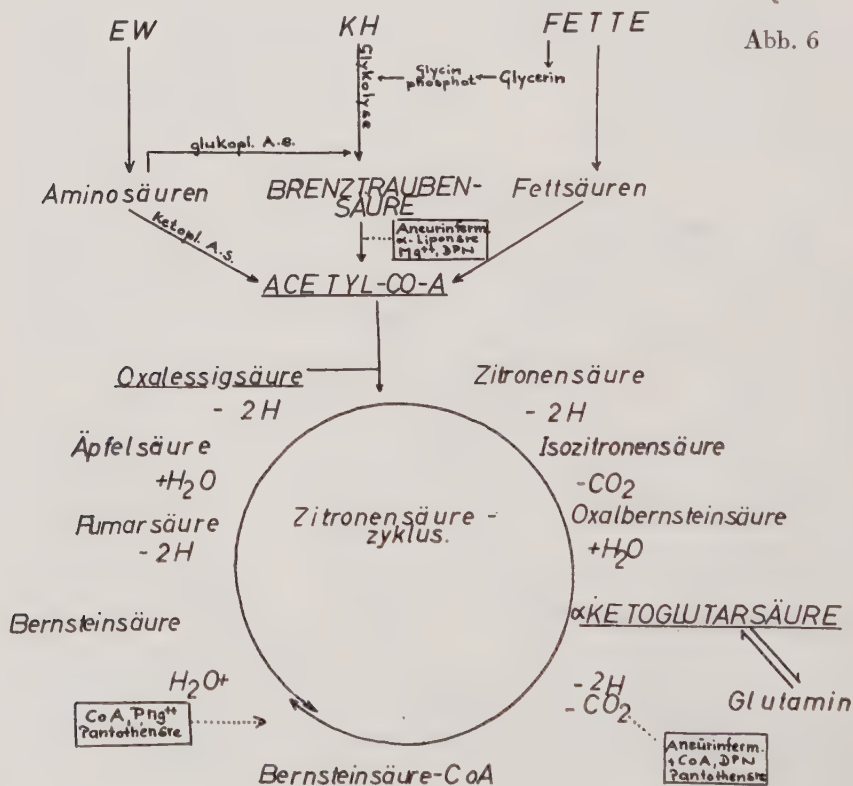
Die geringen Unterschiede in den Konzentrationen zwischen „Herz- und Leber-(Pfortader-)blut“ können damit erklärt werden, daß das aus der vena cava inferior gewonnene Blut direkt von der Leber, dem zentralen Stoffwechselorgan, herkommt und somit noch stärker mit diesen Stoffen gesättigt ist.

Die geringeren Konzentrationen von BTS und α -KGS im Serum zum Vergleich mit dem Vollblut kommen wahrscheinlich dadurch zustande, daß in der Zeit bis zum Gerinnen und Abtrennen des Blutkuchens vom Serum die Plasmaenzymaktivität die Konzentrationen von BTS und α -KGS ändert. Es ist daher erforderlich, die Bestimmungen von BTS, α -KGS und MS mit Vollblut auszuführen. In dieser Arbeit wurden alle Untersuchungen — ohne Ausnahme —, aber mit Serum ausgeführt, da es oft unmöglich war, am Krankbett die sofortige Enteiweißung mit Perchlorsäure durchzuführen, wobei man bemüht war, alle äußeren Bedingungen zu standardisieren.

Die von Parida und Kark (39) festgestellten Beziehungen des BTS-Gehaltes des Serums zur Konzentration der γ -Globuline und dem Thymoltest, sowie zum Bilirubin, können hier teilweise bestätigt werden, nicht aber solche zum Cholesteringehalt.

Es ist schwierig, eine grundlegende, allgemeingültige Erklärung für das Verhalten von Brenztraubensäure, α -Ketoglutarsäure und Milchsäure bei den verschiedenen Leber- bzw. Stoffwechselkrankheiten aufzustellen oder mit Hilfe der Fermentchemie Entgleisungen des Enzymstoffwechsels genau erfahren zu können.

Die zentrale Stellung im ganzen Stoffwechselgeschehen nimmt der Zitronensäurezyklus ein mit seinen grundlegenden Reaktionen für den Zellstoffwechsel. Über ihn wird der oxydative Abbau der Zucker, Fettsäuren und ein beträchtlicher Teil des Proteinkohlenstoffes zu Ende geführt. (Siehe Abb. 6.)



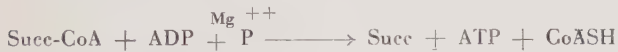
Die BTS bildet die wichtigste Zwischensubstanz des Leberstoffwechsels; ständig werden in der Leber große Mengen von Brenztraubensäure gebildet und verbraucht.

Normalerweise stammt die Hauptmenge der BTS aus dem Abbau der Glukose, von glukoplastischen Aminosäuren (Glykokoll, Alanin, Serin, Threonin u. s. f.) und aus der als Endprodukt des Zitronensäurezyklus entstandenen Oxalessigsäure. Auf der Stufe der BTS greift nach der oxydativen Dekarboxylierung das Coenzym-A ein und es beginnt hier die eigentliche oxydative aerobe Phase, die aus der BTS entstehende Essigsäure wird unter Beteiligung von Mg^{++} -Ionen, Thiaminpyrophosphat (= Aneurinpyrophosphat), DPN als Wasserstoffakzeptor und α -Liponsäure als „aktivierte Essigsäure“ fixiert.

Die Kenntnisse der Einzelheiten dieses außerordentlich komplizierten Vorganges verdanken wir den Untersuchungen von Wieland (40), Decker (41), Holzer (42) und L y n e n (62):



Das Coenzym-A ist für den Energiestoffwechsel der Zelle und die Funktion der Leber von wesentlicher Bedeutung. Die aktivierte Essigsäure, das Acetyl-Co-A, wird durch Kondensation mit Oxalessigsäure zur Zitronensäure aufgebaut. (Es ist dies allerdings noch fraglich, da man sich noch nicht im Klaren ist, welche der drei in Frage kommenden Säuren gebildet wird: Zitronensäure, Isozitronensäure oder cis-Aconitsäure, da alle drei in einem Gleichgewicht miteinander stehen.) Dieser Reaktion, welche durch O c h o a (43) und seine Mitarbeiter aufgeklärt wurde, kommt für den gesamten Stoffwechsel insofern eine Schlüsselstellung zu, als diese den Zitronensäurezyklus einleitet. Das Co-A ist aber auch an der oxydativen Dekarboxylierung der α -KGS in Analogie zum Abbau der BTS, beteiligt. Es entsteht bei der Umwandlung der α -KGS im Zitronensäurezyklus nicht sofort die freie Bernsteinsäure, sondern das entsprechende Coenzymderivat, das Succinyl-Co-A. Im Zuge des Zitronensäurezyklus muß aber dann die freie Säure entstehen, wobei Succinyl-Co-A nach folgender Formel reagiert:



Die Dekarboxylierung ist, wie aus dem Formelbild ersichtlich, mit einer Phosphorylierung gekoppelt.

Daß das Co-A im Stoffwechsel überall dort eingesetzt wird, wo die Karboxylgruppe einer Säure in reaktivem Zustand erforderlich ist oder wo die α -Stellung einer Karbonsäure aktiviert werden soll, also im Zitronensäurezyklus an der Stelle der BTS und der α -KGS, beweisen die Versuchsergebnisse an sechs Patienten, wo durch Gabe von Diphenyläthylelessigsäure und Phenyläthylelessigsäure eine nicht kompetitive Hemmung des Co-A erzeugt wurde.

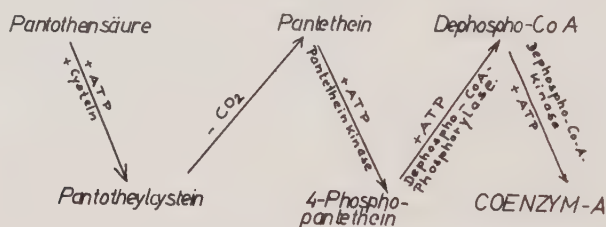
Diese Säuren gehen mit dem Co-A eine Verbindung ein, die als körperfremde Phenyl- (bzw. Diphenyl-)fettsäure weder durch ω -Oxydation (zu kurze Seitenkette, optimal C₉₋₁₁), noch durch β -Oxydation abgebaut werden kann. Es resultiert daraus eine nicht kompetitive Hemmung (Milhaud, Aubert 44) der Azetylierungsreaktion bei Co-A-mangel.

Es wird also in den Zitronensäurezyklus zu wenig aktivierte Essigsäure (oder nur in geringem Maße) eingeschleust, sodaß sich Pyruvat aufstaut und der Blutspiegel ansteigt. Durch den Co-A-mangel wird BTS gar nicht mehr oxydativ dekarboxyliert. Ebenso erklärt sich der Anstieg der α -KGS, da bei dieser Stufe des Zitronensäurezyklus sich auch der Coenzym-A-Mangel bemerkbar macht. Allerdings stieg diese Säure nicht so hoch an, da sie noch zu Umaminierungszwecken herangezogen wird. Die hohen Milchsäurewerte kann man aus einem „Überlaufen“ infolge der BTS-Anhäufung erklären.

Bei der Hepatitis konnte in allen Fällen ein BTS-Anstieg beobachtet werden, fast parallel damit ein gleichzeitiger Abfall der α -Ketoglutarsäure. Bei jeder Leberzellschädigung ist allgemein die oxydative Phosphorylierung

gestört auf Grund eines Coferment- oder Substratmangels unter Hervortreten der glykolytischen Stoffwechselvorgänge. So ist die Fähigkeit der Leber, Kokarboxylase (COC) zu spalten oder aus Thiamin mit normaler Geschwindigkeit COC zu bilden, vermindert, wie Levier und Greis (45) nachwiesen. Die Geschwindigkeit der oxydativen Dekarboxylierung der Brenztraubensäure ist mangels dieses Kofermentes herabgesetzt oder je nach der Schädigung der Zelle sogar teilweise ganz aufgehoben. Der BTS-Gehalt des Lebergewebes und im weiteren Verlauf auch des Blutes, steigt an.

Infolge des Leberparenchymschadens sind auch die anderen Fermentreaktionen stark in Mitleidenschaft gezogen, vor allem die Biosynthese des Co-enzym-A aus der Panthothensäure. Dorfmann, Berkmann und Köser (46), sowie Hoagland und Novelli (47) konnten in Rattenlebern die entsprechenden Enzyme **Pante-theinkinase** und **Dephospho-Co-A-Phosphorylase**, sowie **Dephospho-Co-A-Kinase** nachweisen, die nach folgendem Schema in die Biosynthese eingreifen



Infolge des so entstandenen CoA-Mangels ist eine zusätzliche BTS-Vermehrung und ein „Überlaufen“ zur MS zu erwarten.

Schließlich sei noch ein Hinweis auf die mögliche Störung im Elektronentransport in der eigentlichen Atmungskette gegeben, denn die wesentliche Energie der oxydativen Phosphorylierung wird hier gewonnen. (Siehe Abb. 7.)

Hoagland und Novelli (48) konnten feststellen, daß diese Fermente, auch das Enzymsystem, das Thiamin in COC umwandelt, vor allem im Plasma und in den Mitochondrien der Zelle gefunden werden. So ist es verständlich, daß bei einer Hepatitis, die langsam mit albuminöser Trübung und fettiger Degeneration der Leberzelle beginnt und wobei das Protoplasma (Mitochondrien) selbst schwer geschädigt wird, dieses Fermentsystem allmählich immer mehr in Mitleidenschaft gezogen wird; deshalb steigt die BTS erst langsam an und zu Beginn einer solchen Hepatitis sind die BTS-Werte noch nicht stark erhöht im Vergleich mit chronischen Hepatitisfällen oder der Leberzirrhose. Marche und Marnay (49) bewerten mit Recht hohe BTS-Werte bei Lebererkrankungen als Zeichen schwerer Leberschädigung.

Es ist schwer eine sichere Erklärung für das Verhalten der Ketoglutarensäure zu finden.

Es kann durch den oben begründeten Coenzym-A-Mangel der Zitronensäurezyklus nicht genügend in Gang gesetzt werden, da die zentral stehende aktivierte Essigsäure in nicht ausreichendem Maße gebildet werden kann.

Außerdem ist der Aminosäurehaushalt bei Lebererkrankungen entsprechend der Schwere des Leberparenchymschadens gestört und freies Ammoniak im Blute erhöht, wie Müsing und Wortmann (50) feststellten.

GLUKOSE

glykolyse

Brenztrauben
säure

glu copl.

AMINOSÄURE →

ACE TYL-
CoA

FETTSÄUREN

Isositronensäure

Oxalbersteinsäure

α Ketoglutar säure

Bernsteinsäure + CO₂

Zitronensäure

Fumar säure

Äpfel säure

Oxal essig
säure

2e-DPN

α-Liponsäure → 2e-DPN

2e-DPN

Cytochrome

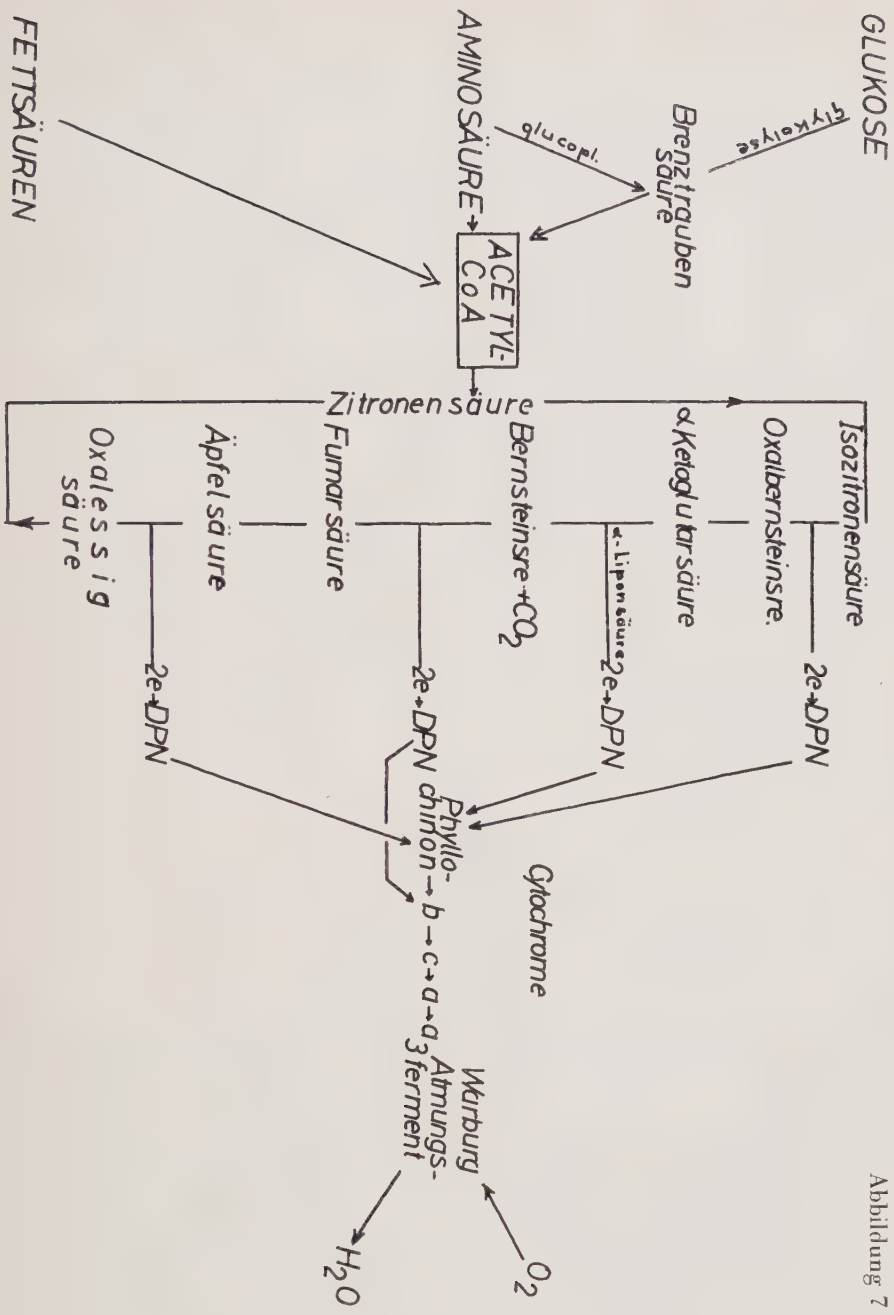
Phyllo-
chinon → b → c → d → d₃

Werbung
Atmungs-
ferment

O₂

H₂O

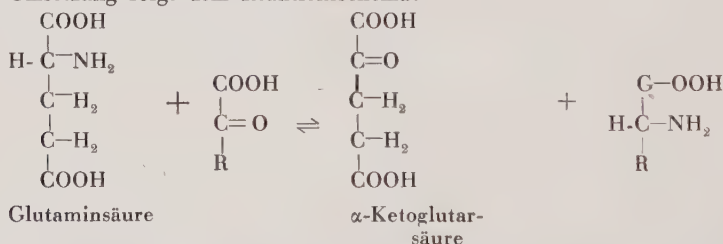
Abbildung 7



Dabei wird die α -Ketoglutar säure aus dem Zitronensäurezyklus genommen und zum NH_4 -Akzeptor. In Gegenwart der α -KGS kann das Ammoniakion mit GsDH in die organische Bindung der Glutaminsäure übergehen. Die Glutaminsäure spielt hier eine wichtige Rolle durch ihre Stellung zwischen dem Kohlehydratstoffwechsel und dem Aminosäurestoffwechsel. Die α -KGS kann nach Abheilung des Leberzellschadens schnell aus Glutaminsäure vom ganzen Organismus wieder gebildet werden, wie aus den Untersuchungen von Klingmüller (51) hervorgeht. Sie wird durch Transaminierung in den Zitronensäurezyklus eingeschleust. Klingmüller und Vogelsang (52) konnten nachweisen durch i.v.-Gaben von Natriumglutamat, daß der α -Ketoglutar säurespiegel abfiel. Es wurde daher eine Umwandlung von Glutaminsäure in die α -Ketoglutar säure angenommen unter NH_4 -Abspaltung und einer Transaminierung des NH_4 -Ions auf die Brenztraubensäure; der Alaninspiegel war entsprechend angestiegen.

Im Leberkoma waren BTS, α -KGS und MS stark erhöht. Es liegen im Koma ausgedehnte Stoffwechselstörungen vor, vor allem werden besonders hohe Ammoniakwerte im Blute gefunden. Es wird vermutet, daß das Ammoniak als toxische Substanz das Koma verursacht oder zumindest eine wichtige Rolle bei der Entstehung desselben spielt. Der schnelle Anstieg der BTS, α -KGS und damit der MS, findet seine Erklärung in dem oben erläuterten Stoffwechselgeschehen, wobei im Koma hepaticum jede Regelung offenbar versagt. Der Anstieg der α -KGS kann entweder rein therapeutisch hervorgerufen sein durch die Gabe von Glutaminsäure, die sich mit NH_4 -Ionen unter Bildung von Glutamin verbinden könnte, die aber infolge der begrenzten Kapazität des Transaminierungssystems des Gesamtorganismus in α -KGS umgewandelt wird.

Diese Umsetzung folgt dem Reaktionsschema:



Als Ketosäure wird die BTS, die im Übermaß vorhanden ist, verwendet. Die Reaktion ist reversibel und erreicht ein Gleichgewicht zwischen den 4 Komponenten, das aber durch den erhöhten NH_4 - und BTS-Spiegel nach rechts verschoben wird, zugunsten der KGS.

Andererseits kann aber auch die Transaminierung von Glutaminsäure aus α -KGS gestört sein (Aminopherasen!), sodaß sich α -KGS zurückstaut (zusätzlich zu dem Co-A-Mangel) und nicht, wie gewöhnlich, die entstehende Glutaminsäure in der Lage ist, das freie Ammoniak als Glutamin zu binden.

Die pathologische Vermehrung der α -KGS kann auch auf eine Störung im Oxydoreduktionsprozeß zurückzuführen sein. Miller und Burk (53) stellten eine Formel auf, die besagt, daß die NH_4 -Ionenkonzentration von dem Quotienten DPN/DPNH und Glutaminsäure/ α -Ketoglutar säure abhängt.

Nach Untersuchungen von Klingmüller, Strohmayer und Martini (31) steigen nun während der Hepatitis nicht nur die BTS und damit die MS an (die Verfasser geben auch eine Erhöhung der α -KGS an!), sondern auch in schweren Fällen, wie Koma und Praekoma, die DPN.

Diese DPN-Zunahme bewirkt also eine erhöhte Konzentration an NH_4 und α -KGS, die beide im Koma, wie die Ergebnisse zeigen, vermehrt im Serum vorkommen.

Beim mechanischen Ikterus, besonders bei intrahepatischen und malignen Verschlüssen und bei Lebermetastasen ergaben die Untersuchungen von BTS und KGS teilweise hohe Werte, vor allem, wenn die Stauung längere Zeit dauerte und eine Schädigung des Leberparenchyms angenommen werden konnte.

Greenstein (54) zeigte in Tierversuchen, daß nichthepatogene Tumoren keinen Einfluß auf die Enzymsysteme der Leber haben, jedoch Lebermetastasen die fermentativen Prozesse beeinträchtigen. Verschlüsse des Ductus hepaticus, sei es durch Stein oder Carcinom, ruft eine starke Dilatation der intrahepatischen Gänge mit Ikterus hervor mit nachfolgender Zellnekrose und atrophischer Schrumpfung des betreffenden Lebergebietes, dessen fermentative Funktionen völlig ausfallen. Das Transaminierungssystem ist aber dabei nicht in dem Ausmaße geschädigt, daß eine KGS-Erniedrigung daraus resultieren könnte. Ebenso ist die DPN-Konzentration nicht gemindert. Ist aber die Leber ganz von Metastasen durchsetzt oder in Folge lang anhaltender Störungen, in Form von Stauungen, des Parenchyms, geschädigt, so kann man auch bei Fällen von mechanischem Ikterus oder Metastasenleber niedrige KGS-Werte beobachten. BTS soll bei jedem mechanischen Ikterus erhöht sein (Horn und Amlung, 32). Sie zeigt geringere Leberschäden schon empfindlich an.

Schwierig ist es — wie auch andere Autoren berichten — die bei der Leberzirrhose gefundenen Werte für die 3 Stoffwechselprodukte zu beurteilen. Bis auf 3 Fälle war die BTS stets mehr oder weniger stark erhöht, ebenso die KGS und MS; die Werte stimmen mit denen der chronischen Hepatitis weitgehend überein. Das Wesen der chronischen Hepatitis als auch der Zirrhose besteht schließlich in einem erheblichen Untergang von Lebergewebe unter starker Entwicklung interstitiellem Bindegewebes. Dieser Prozess braucht aber nicht gleichmäßig entwickelt zu sein. Besonders anfangs können normale Teile mit erkrankten abwechseln. Neben Zuständen der Druckatrophie mit Fett- und Gallenfarbstoffinfiltrationen findet man auch Neubildungen von Leberzellen, die voll funktionstüchtig sind.

Mit Zunahme der zirrhotischen Vorgänge, der atrophischen besonders, wird das neugebildete „Lebergewebe“ aus willkürlichen Stücken und Komplexen von Lobuli zusammengesetzt.

Die Fermentsysteme der Leber sind gestört, der Enzymgehalt wird ins Blut ausgeschwemmt und es können sich bei weit fortgeschrittener Zirrhose sogar Normalwerte einstellen.

Die mitunter erhöhten α -KGS-Werte müssen nicht aus dem Zitronensäurezyklus der Leberzelle stammen, da dieser sehr geschädigt ist, sondern wahrscheinlich aus dem Aminosäurestoffwechsel, nämlich einer Umaminierung von Glutaminsäure mit Oxalessigsäure, wobei die α -KGS und die Asparaginsäure entstehen. Da die BTS auch erhöht ist, kann die andere Möglichkeit der Umaminierung, nämlich:



nicht angenommen werden (sie verläuft auch langsamer!), obwohl Klingmüller (31) bei Glutaminsäurebelastungen mit Natriumglutamat (4 g als 10%ige Lösung) eine Alaninzunahme feststellte; dieses Alanin ist aber nicht allein aus der Blutbrenztraubensäure entstanden, sondern auch aus neugebildeter BTS des Kohlehydratstoffwechsels, da der Alaninanstieg den BTS-Vorrat im Blute um das 5-10fache überstieg.

Seitz, Engelhardt-Goelkel, und Schaffry (Klin. Wschr. 33, 1955: 228) stellten in Versuchen fest, daß bei Zirrhosen eine erhöhte Aktivität von bestimmten Enzymsystemen besteht, obwohl das enzymatisch aktive Eiweiß mit Sicherheit herabgesetzt ist.

Dies beweisen auch die z. T. sehr erhöhten AeDH-Aktivitäten bei Ratten mit einer Allylalkoholnekrose der Leber und bei Patienten im Koma hepaticum und bei Zirrhosefällen.

Worauf diese gesteigerte Aktivität zurückzuführen ist, ist noch unbestimmt; entweder ist die Konzentration des für die maximale Enzymaktivität in der Zelle erforderlichen Enzymeiweißbestandes erhöht oder es hat die Permeabilität der Zelle zugenommen, sodaß vermehrt Stoffwechselsubstrat eindringen kann, wie die Verfasser annehmen. Vor allem die Umaminierung soll bei Leberzirrhosen gesteigert sein, im Gegensatz zu anderen Leberparenchymschäden.

Es kann aber aus all diesen Untersuchungen und Ergebnissen noch keine Schlußfolgerung auf die Stoffwechselabläufe bei Zirrhosen und sonstigen Leberschäden gezogen werden.

Sichere Aussagen sind bis jetzt noch nicht möglich, da es auf biochemischem Gebiete bisher nicht gelungen ist, die oben besprochenen fermentativen Vorgänge eindeutig zu beweisen.

Es wäre noch verfrüht, aus den Ergebnissen über das Verhalten von Brenztraubensäure, α -Ketoglutarensäure und l(+)-Milchsäure bei akuten und chronischen Hepatitiden, Zirrhosen und mechanischem Ikterus und anderen Leberparenchymschäden differential-diagnostische Schlüsse ziehen zu wollen. Immerhin spiegeln aber diese drei Metaboliten die jeweilige Stoffwechselsituation der erkrankten Leber wider, sodaß man doch in der Lage ist, sich in therapeutischen Maßnahmen entsprechend an die Ergebnisse der Serumbestimmungen von Brenztraubensäure, α -Ketoglutarensäure und Milchsäure zu halten.

Zusammenfassung:

1. Es wurde auf die Bedeutung des Zitronensäurezyklus und besonders dessen wichtigste Intermediärstoffwechselprodukte: Brenztraubensäure, α -Ketoglutarensäure und Milchsäure hingewiesen.
2. Frühere Versuche über Fermentbestimmungen wurden angeführt und die bisherigen Wege zur Bestimmung von Brenztraubensäure, α -Ketoglutarensäure und Milchsäure aufgezeigt und diskutiert.
3. Über eine spezielle Methode zur Bestimmung von Brenztraubensäure, α -Ketoglutarensäure und Milchsäure wird ausführlich berichtet, die an 829 Analysen im menschlichen Serum (42 Hepatitisfälle, 5 Komafälle, 27 Fälle von mechanischem Ikterus, 31 Fälle von Leberzirrhosen und 24 Fälle von Leberparenchymschaden verschiedener Genese) ausgeführt wurde, sowie 24 vergleichende Analysen von Nativblut und Serum, 30 vergleichende Analysen von „Herz- und Leberblut“, 48 Analysen im Serum von Patienten mit Diphenyläthyllessigsäurebehandlung und 57 bei gesunden Individuen.
4. Die Ergebnisse wurden angeführt und diskutiert:
Für die Erhöhung der Brenztraubensäure (und Milchsäure) bei allen Fällen von Leberparenchymschaden wurde die vermehrte Glykolyse, teils auch

der Co-A-Mangel bzw. die gestörte Biosynthese des CoA aus Pantothen-säure, teils die verminderte Fähigkeit der Leberzelle, aus Thiamin COC (Thiaminpyrophosphat) zu bilden, verantwortlich gemacht. Eine Störung im Elektronentransport der Atmungskette (oxydative Phosphorylierung), aus der die wesentliche Energie hervorgeht, wurde in Erwägung gezogen. Das verschiedenartige Verhalten der KGS (geringfügiges Absinken bei Hepatitis, Erhöhung im Koma hepaticum, beim mechanischem Ikterus und teilweise in Fällen von Zirrhose) könnte auf eine Störung im Transaminierungs-Oxydoreduktionsprozess zurückzuführen sein. Der Anstieg der KGS im Koma als therapeutischer Effekt wurde diskutiert.

5. Die Ergebnisse können nicht mit solchen von spezifischen Leberfunktionsproben verglichen werden, sondern spiegeln das momentane Mikrostoffwechselbild wider; auch bei anderen Erkrankungen wird eine Erhöhung der Brenztraubensäure und Milchsäure beobachtet. Es ist noch nicht möglich, mit Hilfe der Bestimmung von Zwischenstoffwechselprodukten bestimmte differential-diagnostische, wohl aber therapeutische Schlussfolgerungen zu ziehen.

Die tabellarisch zusammengestellten Untersuchungsergebnisse bei den einzelnen Leberkranken können vom Verfasser angefordert werden; auf Abdruck in dieser Arbeit mußte aus Platzmangel verzichtet werden!

Literatur:

1. Friedemann, T. E. und Haugen, A. E.: J. biol. Chem. 147, 1943: 415. — 2. Krebs, H. A.: Biochem. J. 32, 1938: 108. — 3. Markees, S.: Experim. 7, 1951: 314. — 4. Pletscher, A., Renschler, H.: Helv. med. acta Vol. 20, Basel. — 5. Markees, S.: Schweiz. med. Wschr. 81, 1951: 1145. — 6. Warburg, O., Christian, W.: Biochem. Z. 286, 1936: 81. — 7. Hohorst, H. J.: Biochem. Z. 328, 1956: 509. — 8. Hess, B., Gehm, E.: Klin. Wschr. 33, 1955: 91. — 9. Beisenherz, G., Boltze, H. J., Bücher, Th., Czok, R., Garbade, K. H., Meyer-Arendt, E., Pfeleiderer, G.: Z. Naturforschung 8b 1953: 555. — 10. Bock, H. E., Löhr, G. W., Waller, H. D.: Klin. Wschr. 2, 1958: 56. — 11. Horn, H. D., Bruns, F. H.: Biochem. biophys. Acta 21, 1956: 378. — 12. Wallenfels, K.: unveröffentlicht. — 13. Eppinger, F.: Permeabilitätspathologie Wien, Springerverl. 1949. — 14. Ladue, J. S., Wroblewski, F., Karmen, A.: Scienc. 120, 1954: 497. — 15. Hess, B., Raftopoulos, R.: Arch. klin. Med. 1957: 204. — 16. Ulmer, D. D., Wacker, W. E. C., Vallee, B. L.: New Engl. J. med. 255, 1956: 449. — 17. Karmen, A., Wroblewski, F., Ladue, J.: J. clin. Invest. 34, 1955: 126. — 18. Amatuzio, D.: J. clin. Invest. 29, 1950: 1489. — 19. Kleberg, I.: Feder. proc. 7, 1953: 45. — 20. Bauer, H.: Biochem. Z. 327, 1956: — 21. Amatuzio, D.: J. clin. Invest. 31, 1952: 751. — 22. Kipping, H.: Z. innere Med. 9, 1954: 608. — 23. Seligson, D., Smith, H., Ettinger, R.: J. clin. Invest. 32, 1953: 273. — 24. Bing, R. J.: Klin. Wschr. 34, 1956: 1. — 25. Pfeiffer, E., Schoeffelin-Steigerwald, H.: Deutsch. Med. Wschr. 81, 1956: 837. — 26. Pfeiffer, E.: Klin. Wschr. 34, 1956: 845. — 27. Hess, B.: Klin. Wschr. 33, 1955: 540. — 28. Gey, F.: Z. physiol. Chem. 294, 128. — 29. Altschule-Holiday, M. D.: Kongreßblatt 147, 1955: 19. — 30. Hess, B.: Klin. Wschr. 33, 1955: 99. — 31. Strohmayer, G., Martini, G. A., Klingmüller, V.: Klin. Wschr. 35, 1957: 385. — 32. Martini, G. A.: Acta hep. 4/1, 255. — 33. Bessmann, R.: Americ. J. Chem. 21, 1956: 843. — 34. Bessmann, R.: J. clin. Invest. 34, 1955: 622. — 35. Lodigiani, E.: Zentralblatt 161, 1955: 301. — 36. Horn, A. D., Amelung, D.: Dtsch. Med. Wschr. 82, 1957: 17. — 37. Gastaldi, I., Maggi, S.: Policlin. sez. med. 62, 1955: 353. — 38. Lasch, Fr.: Dtsch. Med. Wschr. 78, 1953: 975. — 39. Parida, K., Kark, K. M.: J. labor. a. clin. med. 47, 1956: 42. — 40. Wieland, H., Lynen, F., Decker, H., Holzer, F.: Klin. Wschr. 32, 1954: 386. — 41. Lynen, F., Decker, H.: Ergebn. d. Physiol. biol. chem. u. experim. Pharmak. 49, 1957: 328. — 42. Holzer, F.: Angew. Chemie, 64, 1952: 248. — 43. Ochoa, S.: Experim. 12, 1956: 99. — 44. Milhaud, G., Aubert, I. P.: Adv. encymol. 15, 1954: 183. — 45. Levier, W. M., Greis, M. E.: J. pharm. exper. Therap. 79, 1943: 240. — 46. Dorfmann, A., Berkman, S., Köser, S. J.: J. biol. Chem. 114, 1942: 392. — 47. Hoagland, B., Novelli, G. D.: J. biol. Chem. 207, 1954: 767. — 48. Hoagland, B., Novelli, G. D.: J. biol. Chem. 206, 1954: 533. — 49. Marche, J., Marnay, O.: Bull.

Ass. Etuds Physiol. path. 2, 1947: 127. — 50. Müsing, D., Wortmann, W.: Dtsch. med. Wschr. 81, 1956: 1853. — 51. Klingmüller, V.: Biochemie, Physiologie und Klinik d. Glutaminsäure; Aulendorf; Editio Cantor. — 52. Klingmüller, V., Vogel-sang, H.: Biochem. Z. 300, 1955: 97. — 53. Miller, H., Burk, D.: J. med. Ass. Israel proc. 14, 1955: 707. — 54. Greenstein, J. P.: Americ. J. Ass. 148, 1952: 697. — 55. Markees, S.: Schw. Med. Wschr. 80, 1950: 1079. — 56. Schön, H., Sitzmann, F. C., Barth, G.: Strahlentherapie 105, 1958: S. 4. — 57. Henley, K. S., Wiggins, H. S., Pollard, H. M.: J. labor. a. Clin. Med. 47, 1956: 978. — 58. Strecker, H. J.: Arch. Biochem. 32, 1951: 448. — 59. Dixon, M., Zerfas, L. G.: Nature 143, 1939: 557. — 60. Straub, F. M. B.: Biochem. J. 34, 1940: 483. — 61. Dawson, A. M., Groote, J., Rosenthal, W., Scherlock, Sheila: Lancet 1957/I, 392. — 62. Lynen, F.: Angew. Chemie 63, 1951: 47.

LEBENS LAUF

Ich wurde am 17. November 1935 in Thurn bei Heroldsbach geboren, als Sohn des verstorbenen gräfl. Rentamtman Dr. jur. Hans Sitzmann und seiner Ehefrau Josepha Sitzmann, geb. Schirner.

Vom September 1943 bis Juni 1946 besuchte ich in Heroldsbach die Volksschule. Vom September 1946 an war ich Schüler der Oberschule in Forchheim/Obfr. An dieser Schule legte ich im Juni 1953 die Reifeprüfung mit Erfolg ab.

Vom Wintersemester 1953/54 an studierte ich an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen Medizin

Nach 11 Semestern Studium habe ich am 7. Juli 1959 vor dem Ausschuß für ärztliche Prüfung in Erlangen das medizinische Staatsexamen bestanden.

